

MIKROFLUIDIKA V BIOANALYTICKÉ INSTRUMENTACI

PETR SMEJKAL^{a,b} a FRANTIŠEK FORET^a

^a Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Oddělení bioanalytické instrumentace, Veveří 97, 602 00 Brno, ^b Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

smejkal@iach.cz, foret@iach.cz

Došlo 21.1.11, přijato 2.9.11.

Klíčová slova: mikrofluidika, bioanalytika, lab chip (lab on a chip), miniaturizace

Obsah

1. Úvod
2. Trendy v mikrofluidice
 - 2.1. Vývoj mikrofluidických systémů
 - 2.1.1. Historie a současnost ve vývoji μ -TAS
 - 2.1.2. Miniaturizace v oblasti HPLC
 - 2.2. Komerčně dostupné mikrofluidické systémy
 - 2.2.1. Caliper Life science
 - 2.2.2. Agilent Technologies
 - 2.2.3. Shimadzu
 - 2.2.4. Eksigent
3. Závěr

1. Úvod

Bioanalytika, jako disciplína analytické chemie, zabývající se analýzou xenobiotik (látky tělu cizí jako např. léčiva, drogy a jejich metabolity) a biotik (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny, metabolity) je mnohdy stavěna před problém vystačit s omezeným množstvím vzorku. Z tohoto důvodu se na trhu objevují nové metody, které tento nárok splňují a zároveň jsou schopny dodávat robustní a reprodukovatelné výsledky. Nedílnou součástí tohoto vývoje je miniaturizace a v současné době jsme svědky nástupu analyzátorů pracujících na bázi mikrofluidických čipů. Tyto systémy jsou často označovány jako „Mikro Total Analysis System“ (μ -TAS). Název μ -TAS vyjadřuje snahu o zkrácení cesty vzorku laboratoří a sloučení co největšího množství jednotkových operací do analyzátoru velikosti např. pouhé kreditní karty. Vrcholem tohoto vývoje by pak mohla být laboratoř na čipu (Lab-on-a-chip). Tuto myšlenku mohou znát fandové sci-fi např. z filmové série Star Trek. Pro okamžitý a kompletní rozbor zdravotního stavu pacienta postačilo použít speciální skener, který se vešel do jedné ruky. Na trhu se stále častěji setkáváme se systémy, které jsou označovány jako mikrofluidické analyzá-

tory anebo ve svém názvu nesou předponu nano. Převážně se jedná o přístroje, které jsou založeny na principu elektroforetických metod a kapalinové chromatografie.

2. Trendy v mikrofluidice

Snaha vytvořit dokonalý mikrofluidický systém se dá považovat za snahu přiblížit se něčemu, čím příroda dávno disponuje, příkladem pak může být např. lidský organismus¹. Miniaturizace v oboru analytické chemie je trendem, který se začal intenzivně vyvíjet na přelomu 80. a 90. let a to díky finanční podpoře dvou nezávislých projektů Spojených států amerických. První z nich byl financován agenturou DARPA (Defense Advanced Research Project Agency). Cílem tohoto projektu bylo vybavit armádu snadno ovladatelnými a přenosnými analyzátoři. Časem se ukázalo, že tyto systémy budou vhodné např. i pro laboratoře rozvojových zemí^{2,3}. Druhý projekt „Human Genome Project“ plánovaný na 15 let byl formálně započat v roce 1990 (řízen a financován „U. S. Department of Energy“ a „National Institutes of Health“). Díky DNA sekvenátorům „Molecular Dynamics MegabaCE“ a „Applied Biosystems 3700“ byl tento projekt ukončen o dva roky dříve (2003)⁴. Oba zmíněné projekty tak odstartovaly masivní nástup vývoje μ -TAS (cit.^{5,6}).

2.1. Vývoj mikrofluidických systémů

2.1.1. Historie a současnost ve vývoji μ -TAS

Mikrofluidické systémy prochází fází intenzivního výzkumu již dvě desetiletí, zkratka μ -TAS (mikro total analysis system) byla poprvé použita⁷ v roce 1990. Čipy, které měly nahradit kapiláry, byly v počátcích svého vývoje založeny pouze na designu rovných kanálků. Do dnešních dnů se z této jednoduché konstrukce vyvinuly přes separační kříž na poměrně komplikovaná zařízení, která integrují i několik na sebe navazujících kroků analýzy. Tato část se ve stručnosti věnuje historickému vývoji mikrofluidických systémů. Výběr přehledných prací zabývajících se miniaturizací a vývojem mikrofluidických systémů v oblasti bioanalytiky v posledních třech letech je shrnut v tab. I.

DNA a genomika

První pokusy o provedení separace DNA na čipu se objevily již v 90. letech 20. století. V roce 1994 Wooley a Mathies pomocí metod fotolitografie a chemického leptání skleněných destiček připravili čip s rovnými kanálky. Na tomto čipu během deseti minut sekvenovali s 97% přesností 150 párů bází dlouhý řetězec DNA (cit.⁸). Schéma čipu se dvěma na sebe kolmými kanálky (dávkovací kříž) je na obr. 1. První kanálek slouží pro nadávkování vzorku a v druhém pak probíhá separace a analýza.

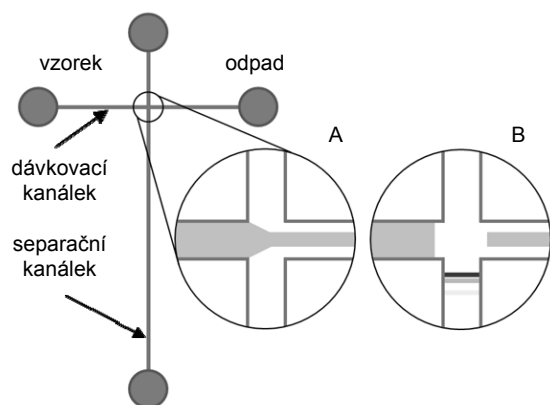
Tabulka I

Review miniaturizací v oblasti bioanalytické instrumentace za poslední tři roky

Okruh	Rok	Stručný popis, čím se review zabývá	Počet stran	Obrázky/ tabulky	Počet odkazů	Lit.
Výroba, instrumentace a modifikace mikrofluidických zařízení	2008	Velmi přehledný výčet materiálů a technik pro výrobu mikrofluidických čipů	23	20/4	306	44
	2008	Paralelní detekce analytů na multikanálových čipech + aplikace	10	4/1	62	45
	2009	Způsoby spojování (slnutí) termoplastů při výrobě mikrofluidických čipů (uzavření mikrokanálek)	16	9/3	111	46
	2009	Mikrofluidické čipy určené pro Free-flow elektroforézu	12	11/0	57	47
	2009	Využití nativní fluorescence pro detekci analytů na mikrofluidických čipech	11	9/1	84	48
	2009	Elektrochemické sensory pro mikrofluidické analyzátory	9	5/0	104	49
	2010	Optické detektory pro mikrofluidické analyzátory	27	19/1	95	50
	2010	Kategorizace a výčet komponent mikrofluidických systémů, pokus o uspořádání názvosloví	21	1/9	163	51
	2010	Přehled technik používaných pro míchání roztoků na mikrofluidických analyzátorech	14	6/4	120	52
	2010	Modifikace povrchu PDMS (chemické, fyzikální)	15	7/1	108	53
Genomika	2009	Analýza DNA na mikrofluidických čipech s elektrochemickou detekcí	12	5/1	65	54
	2010	Diagnóza chorob spojených s mutací a poruchami DNA	20	6/6	193	55
Genomika a proteomika	2009	Přehled prací zabývajících se mikrofluidikou pro analýzu NK a proteinů	10	9/1	129	56
Proteomika	2008	CE analýza proteinů na mikrofluidických čipech	22	13/0	151	57
	2009	2D separace proteinů na mikrofluidických čipech	8	7/0	62	58
	2010	CE analýza proteinů na mikrofluidických čipech (doplnění článku z roku 2008)	27	20/0	177	59
Analýza buněk	2008	Pokroky ve vývoji μ TAS pro analýzu buněčných membrán	8	3/0	90	60
	2009	Analýza jediné buňky v kapce	10	13/0	47	61
	2010	Separace neznačených buněk na čipu v závislosti na jejich velikosti, tvaru, hustotě, povrchových strukturách, ...	19	6/1	122	62
	2010	Pěstování buněčných kultur na čipu	13	7/0	56	63
	2010	Pěstování a výzkum tkáňových buněk na čipu	13	6/1	133	64

Výhodou tohoto uspořádání je opakovatelné dávkování vzorků v objemech řádu nanolitřů. Potřebnou detekční citlivost dodává systému laserem indukovaná fluorescence (LIF). Díky použití zobrazovací CCD (Charge-Coupled Device) kamery je možno zaznamenat a optimalizovat průběh dávkování např. při separaci vzorku rhodaminu B a fluoresceinu⁹. V roce 1996 byl vyvinut čip, na kterém se podařilo naštípat vzorek modelové DNA na fragmenty během komigrace s enzymem. Ty byly následně separovány a analyzovány pomocí LIF detekce¹⁰. Ve stejném roce

byla publikována práce, která demonstrovala spojení CE separačního kříže na skleněném čipu s PCR (polymerázová řetězová reakce) komůrkou, která byla vytvořena mezi dvěma křemennými destičkami (každá 1 mm silná). Vyhřívání PCR komůrky bylo zajištěno odporovou vrstvou, na kterou bylo přivedeno napětí přes napařenou vrstvu zlata¹¹. V roce 2000 se v obdobné práci podařilo vytvořit spojení PCR-CE na jednom čipu a to díky použití Peltierova článku¹². Čip publikovaný v roce 2005, byl určený pro analýzu polymorfismu délky restrikč-



Obr. 1. Schéma separačního kříže; výřez – rozhraní dávkovacího a separačního kanálku (A dávkování vzorku; B separace vzorku)

ních fragmentů (RFLP) a kombinoval všechny kroky analýzy (PCR, restriční digesce a CE)¹³. V současnosti je trendem ve vývoji mikroanalytických zařízení „analýza jediné buňky“. μ -TAS na této úrovni byl představen roku 2008 (cit.¹⁴). Na jediném čipu byly zachyceny jednotlivé buňky, z jejichž lyzátu byla afinitní chromatografií získána mRNA. Ta byla následně enzymem RNA reverzní transkriptasa přepsána do pořadí cDNA.

Peptidy, proteiny a proteomika

Největší překážkou pro analýzu funkčních a regulačních proteinů je jejich nízká koncentrace a obrovská diverzita. V případě analýzy DNA lze její koncentraci zvýšit pomocí PCR. Žádná takto „snadná“ a efektivní metoda pro amplifikaci proteinů neexistuje. Jedním z trendů miniaturizace je vystačit s malým množstvím vzorku, a proto se mikrofluidika na poli proteomiky nabízí jako výhodné řešení¹⁵. Klasickou metodou pro dělení proteinů podle jejich velikosti je polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Tato metoda je poměrně náročná, zdoluhavá a je používána již od roku 1967 (cit.¹⁶). Separace šesti proteinů v rozsahu hmotností od 9 do 116 kDa byla popsána roku 1999 na čipu metodou SDS/CGE (cit.¹⁷). Čip navržený pro SDS-PAGE proteinů, který je v současnosti určen pro Agilent Bioanalyzer 2100, byl představen¹⁸ v roce 2001. Tento čip umožňuje postupnou analýzu až deseti vzorků a kombinuje pět kroků analýzy (reakce s fluorescenční barvou, nadávkování vzorku, separace analytů, naředění – snížení fluorescenčního pozadí a detekce). Nejvyužívanější separační metodou v proteomice je 2D elektroforéza. Analyty jsou v první dimenzi separovány izoelektrickou fokusací a v druhé dimenzi metodou SDS-PAGE. Po obarvení gelu vzniknou spoty, které tvoří „2D mapu“ proteinů. Jednotlivé spoty jsou vyříznuty a analyzovány přístupem „bottom up“ nebo „top down“¹⁹. Vzhledem k pracnosti a zdoluhavosti tohoto postupu se objevilo mnoho prací, které se pokusily o pře-

sun 2D elektroforézy na čip²⁰. Prvním takovým pokusem byla práce publikovaná²¹ již v roce 1998. Čip z křemenného skla se skládal z jednoho 16 mm dlouhého kanálku (1D) a z 500 kanálků dlouhých 5 mm (2D), bohužel publikace nezahrnovala výsledky separace proteinů. Práce, kde se podařilo ve dvou dimenzích separovat tři proteiny na čipu, byla publikována až o čtyři roky později²². Použitý čip byl tvořen šesti PDMS bloky. Dvourozměrná separace proteinů buněčného lyzátu bakterie *Escherichia coli* na jediném čipu byla publikována²³ v roce 2007. Čip obsahoval kanálek pro izotachoforézu (1D) a dvacet kanálků pro nativní elektroforézu (2D). Pro detekci a další charakterizaci proteinů/peptidů a v současnosti i oligosacharidů je nejvhodnějším analyzátozem hmotnostní spektrometr²⁴. V praxi jsou využívány dva způsoby ionizace a to ESI (electrospray ionization) a MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization). ESI je vhodná pro on-line spojení čipů s MS, na druhou stranu MALDI poskytuje jednodušší spektra a tak je v proteomice využívána častěji. Několik prací zabývajících se on-line spojením čipů s MS detekcí bylo věnovaných i ionizaci pomocí MALDI²⁵.

Další biologicky významné látky

Naprostá většina prací věnujících se vývoji μ -TAS pro analýzu biologicky významných látek je zaměřena na nukleové kyseliny a proteiny. Analýza dalších látek včetně cukrů a tuků je zatím méně propracována. Analýza tuků a mastných kyselin je složitá díky jejich špatné rozpustnosti ve vodných pufrch a nutnosti používání micelárních nebo nevodných systémů. CE karbohydrátů je komplikovaná vzhledem k nutnosti jejich derivatizace²⁶. Oligosacharidy hrají významnou roli v posttranslační syntéze proteinů – glykosylaci. Glykany tedy mohou sloužit jako markery některých onemocnění. Typickým příkladem je změněná glykosylace proteinů spojená s cirrhózou jater²⁷ nebo s nádorovými chorobami. Z tohoto důvodu se analýza glykanů jeví jako atraktivní screeningová metoda. Cukry je nutno derivatizovat, aby byla umožněna jejich elektroforetická separace a detekce. Nejvíce diskutovanou značkou pro derivatizaci *N*-glykanů (k proteinu konjugovány přes dusík) je 8-aminopyren-1,3,6-trisulfonová kyselina (APTS). APTS má podobné absorpční i emisní spektrum jako fluorescein (LIF detekce glykanů) a zároveň poskytuje záporný náboj cukrům, který umožní CE separaci. *N*-Glykany lidského séra značené APTS se podařilo separovat během 12 min na čipu s kanálkem o efektivní separační dráze 11,5 cm v roce 2004 (cit.²⁹). Podobná práce na čipu vyrobeném z polymethylmethakrylátu (PMMA) se separačním kanálkem o efektivní separační dráze 30 cm byla publikována³⁰ roku 2006. V roce 2007 vyšla práce, ve které byl na čipu s kanálkem (tvar spirály) o efektivní separační dráze 22 cm sledován glykanový profil pacientky s rakovinou prsu³¹. Nedávno bylo demonstrováno i možné využití přístroje, původně určeného pro CGE nukleových kyselin na čipu i pro analýzu oligosacharidů, např. pro screening pacientů³² s rakovinou prostaty 2010.

Micro-flow cytometrie

Průtoková cytometrie v biochemických laboratořích usnadňuje a urychluje stanovení počtu krvinek v krvi pacientů. Miniaturizace tohoto zařízení byla publikována³³ v roce 1999. Mikrofluidické zařízení pro třídění buněk bylo vytvořeno o rok dříve³⁴. V roce 2003 byl představen čip, který obsahoval komůrku na zachycení a pěstování roztržidných buněk³⁵. Díky tomuto uspořádání bylo sníženo riziko ztráty buněk a možné kontaminaci při zacházení s nimi. Pokroky ve vývoji mikrofluidických zařízení pro analýzu buněk jsou dokumentovány v přehledné práci³⁶.

K historii a vývoji mikrofluidických zařízení v oblasti bioanalytické instrumentace lze závěrem dodat, že trend miniaturizace směřuje k propojení všech zmíněných aplikací na jediný čip. Cílem, ke kterému by se výzkum mohl v dohledné době ubírat, je μ -TAS jednotka, která by dokázala zachytit požadovanou buňku a analyzovat její genomický, proteomický, metabolomický, glykomický, či jiný omický profil.

2.1.2. Miniaturizace v oblasti HPLC

Na rozdíl od CE, miniaturizace v oblasti kapalinové chromatografie vyžaduje podstatně složitější přístup a je nezbytné čelit celé řadě složitě řešitelných problémů:

Pumpy

Se zmenšujícími se vnitřními průměry kapilár a kolon vzrůstá i odpor kladený systémem proti průtoku mobilní fáze. Z tohoto důvodu je nutné do systému zařadit pumpy, které jsou schopny pracovat při extrémně vysokých tlacích, ale zároveň při nízkých průtocích.

Mrtvé objemy

Každý spoj znamená zvyšování mrtvého objemu a vnášení nepřesností do procesu analýzy. Řešení se nabízí v podobě LC na čipech. Čipy minimalizují nezbytný počet spojů na minimum a lze je kombinovat s detekcí hmotnostním spektrometrem³⁷.

Dávkovací smyčka

Čím menší kolona, tím menší kapacita pro analyty ve vzorku. Mikrofluidická zařízení na principu LC umožňují dávkovat řádově nanolitry vzorku.

Gradientová eluce a splitování mobilní fáze

S měnicím se složením mobilní fáze se mění její viskozita a tím se mění tlak pro její průtok. Komerční systémy řeší tento problém softwarově. Dražší systémy obsahují průtokoměry, které řídí průtok zpětnou vazbou. Dalším problémem gradientových elucí je splitování toku. Po smíchání roztoků je většina mobilní fáze bez užitku odváděna přímo do odpadu. Jedno z řešení tohoto problému využívá ventil s několika smyčkami. Každá ze smyček je naplněna mobilní fází s různou eluční silou. V průběhu analýzy je ventil postupně přepínán a požadovaná mobilní fáze je přiváděna na kolonu³⁸.

Kolona

Srdcem každého kapalinového chromatografu je separační kolona. O nano-LC technikách se mluví, pokud je použita kolona připravená v kapiláře s vnitřním průměrem mezi 10 a 100 μm . Pokud je tento průměr mezi 100 a 500 μm , jedná se o kapilární-LC. Tak jako u klasické HPLC i u nano-HPLC jsou nejpoužívanější kolony náplňové. Velikost částic sorbentu se pohybuje mezi 3–5 μm . Sorbenty o velikosti částic 1,5–1,8 μm jsou určeny pro „ultra performance“ kapalinovou chromatografii (UPLC)³⁹. Nevýhodou náplňových kolon je omezená možnost volby typu sorbentu u komerčních kolon. Ve výzkumu si často vědci vyrábí a plní svoje vlastní kolony, ale vzhledem k náročnosti tohoto procesu se lze stále častěji setkat s OT (Open Tube) a monolitickými kolonami. OT kolony jsou prázdné kapiláry se stacionární fází imobilizovanou přímo na jejich vnitřní stěně (kovalentní vazba, adsorpce). Největší nevýhodou OT kolon je jejich nízká kapacita. Tento problém lze řešit použitím delší kolony, ovšem za cenu zvýšeného tlakového spádu. Monolytické kolony poskytují velký povrch pro imobilizaci stacionární fáze, ale zároveň nekladou tak velký odpor protékající mobilní fázi jako kolony náplňové. Kontrola polymeračních podmínek umožňuje připravovat široké spektrum typů kolon, jak na bázi organických, tak i anorganických polymerů. Monolytické kolony se staly předmětem výzkumu zejména od konce 80. let 20. století⁴⁰ a dnes jsou již komerčně dostupné. I přes prvotní nedůvěru se prokázalo, že monolytické kolony dokáží konkurovat nejlepším kolonám náplňovým. Hybridem mezi monolitickými a OT kolonami jsou „Porous Layer Open Tubular“ (PLOT) monolytické kolony. Tyto kolony poskytují oproti OT kolonám daleko větší interakční povrch, ale zároveň kladou menší odpor protékající mobilní fázi ve srovnání s klasickými monolytickými kolonami⁴¹.

Detektor

Pro detekci analytů v systému nano-HPLC je nezbytné používat analyzátoři s co největší citlivostí. Nejčastěji používané detektory u nano-HPLC jsou UV/VIS a hmotnostní spektrometry. Vzhledem ke krátké optické dráze kapilár je detekce optickými metodami často řešena Z nebo U detekčními celami⁴². Nano-LC systémy jsou vzhledem k malým průtokům velmi vhodné pro spojení s elektrospřevodnou hmotnostní spektrometrií. Toto spojení nachází uplatnění především v proteomice⁴³.

2.2. Komerčně dostupné mikrofluidické systémy

Vzhledem ke snaze společností udržet si pozici na trhu je neustálé přizpůsobování se nejnovějším instrumentálním trendům včetně miniaturizace naprostou nezbytností. Díky tomu lze narazit na široké spektrum komerčně dostupných mikrofluidických systémů. Částečný přehled firem, zabývajících se mikrofluidikou, je v tab. II. V následujícím textu je ve stručnosti uvedeno několik produktů předních výrobců mikrofluidických zařízení.

Tabulka II
Seznam společností zabývajících se mikrofluidikou^a

Společnost	Webové stránky	Popis společnosti
Abbott Laboratories	http://www.abbott.com	Kanadská společnost specializující se v oblasti „health care“ (od nutričních doplňků až po laboratorní bioanalyzátory)
Advanced Liquid Logic	http://www.liquid-logic.com/	Společnost vznikla na půdě Duke university v Severní Karolině v USA. Zabývají se digitální mikrofluidikou
Agilent Technologies	http://www.agilent.com	Americká společnost, odnož Hewlett-Packard. Zabývají se výrobou bioanalytických zařízení. V odvětví Lab-on-a-chip nabízí CE a nanoHPLC na čipu
Applied Biosystems	http://www.appliedbiosystems.com/	Americká společnost začínala pod názvem GeneCo. Přístroje této společnosti byly použity pro sekvenaci DNA v Human Genome project
Aviva Biosciences	http://www.avivabio.com/	Americká společnost, na trhu prorazili se SealChip určeným pro screening léčiv
Biacore	http://www.biacore.com	Švédská společnost v současnosti pod GE Healthcare. Hlavní oblast zájmu – charakterizace protilátek a proteomika. Biosenzory na principu SPR (surface plasmon resonance)
Bio-Rad	http://www.bio-rad.com	Americká společnost, původně prodej chemikálií pro biochemický a farmaceutický průmysl. V současnosti daleko širší pole působnosti, mikrofluidika- Experion Automated Electrophoresis Station
Biotrove	http://www.biotrove.com	Společnost přešla pod vedení Applied Biosystems. Zabývali se analýzou DNA – RealTime PCR, TaqMan
Caliper Life Sciences	http://www.caliperls.com/	Americká společnost zabývající se mikrofluidikou dvacet let. Příkladem je LabChip GX
Cellix	http://www.cellixltd.com	Irská společnost, která nabízí čipy pro sledování pohybu a adheze krevních buněk.
Cepheid	http://www.cepheid.com	Americká společnost, přístroje pro analýzu DNA s real-time PCR
Dolomite	http://www.dolomite-microfluidics.com	Anglická společnost, design a výroba mikrofluidických čipů
Eksigent Technologies	http://www.eksigent.com	Americká společnost, vývoj, výroba, prodej a servis chromatografických a extrakčních systémů. V oblasti mikrofluidiky- cHiPS nanoFlex
Emerald BioSystems	http://www.emeraldbiosystems.com	Kanadská společnost, která nabízí mikrofluidické přístroje pro proteinovou krystalografii
Evotec Technologies	http://www.evotec-technologies.com/	Část německé společnosti Evotec (http://www.evotec.com) odkoupená americkou PerkinElmer. CycloClone = mikrofluidické zařízení pro analýzu, imaging a klonování krevních buněk
Fluidigm	http://www.fluidigm.com	Americká společnost, analýza NK na principu dPCR (digital PCR) – BioMark System – real-time qPCR a dPCR na čipu; TOPAZ Systém- proteinová krystalografie na čipu
Fraunhofer	http://www.ibmt.fraunhofer.de/fhg/ibmt_en/	Německá společnost, vývoj v oblasti biomedicínského inženýrství
Gyros	http://www.gyros.com	Švédská společnost. Gyros immunoassay platform – mikrofluidické imunoanalýzy na „kompaktních discích“
Helicos	http://www.helicosbio.com	Americká společnost. HeliScope Single Molecule Sequencer- sekvenace DNA, pracuje na principu tSMS (true Single Molecule Sequencing)
Ibidi Integrated BioDiagnostics	http://www.ibidi.de/	Německá společnost. Design, výroba a prodej čipů pro kultivaci a hodnocení bakterií

^a Tabulka aktualizována ke dni 13. leden 2011

Tabulka II
pokračování

Společnost	Webové stránky	Popis společnosti
IntegenX	http://integenx.com/contact/	Americká společnost. Mikrofluidický analyzátor Apolo 100 – sekvenace DNA. Na konci roku 2011 má být uveden Apolo 200.
Liquidia Technologies	http://www.liquidia.com/	Americká společnost. Vyrábí („tiskne“) částice o velikosti desítek nanometrů až stovky mikrometrů. Tvar dle požadavků.
Micalyne Inc.	http://www.micalyne.com/	Kanadská společnost zabývající se vývojem a výrobou nejen mikrofluidických čipů.
Microfluidics	http://www.microfluidicscorp.com/	Americká společnost vyrábějící nanočástice pro farmaceutický, biotechnologický, chemický, kosmetický, aj. průmysl
Micronics	http://www.micronics.net	Americká společnost. Vývoj mikrofluidických přístrojů pro <i>in vitro</i> diagnózu.
Micronit Microfluidics BV	http://www.micronit.com/	Holandská Firma. Design a výroba mikrofluidických čipů ze skla
Nanoterra	http://www.nanoterra.com/	Americká společnost zabývající se „Soft Litografií“
Network Biosystems	http://www.networkbiosystems.com	Americká společnost. Vývoj mikrofluidických zařízení pro molekulární biologii.
NiCoForm inc.	http://www.nicoform.com/	Americká firma, která mimo jiné vyrábí i formy pro výrobu mikrofluidických čipů
PRECISION-micro	http://www.precisionmicro.com/23/microfluidic-components/	Anglická společnost zabývající se mimo jiné také designem a výrobou mikrofluidických čipů
Pyrosequencing AB	http://www.pyrosequencing.com	Přešli pod německou společnost Qiagen. PyroMark- pracuje na principu pyrosekvenace – kvantifikace metylace DNA, mutací DNA
Roche, Cobas	http://www.cobas-roche.co.uk	Švýcarský koncern Roche. Cobas- biochemické analyzátor, „Point of Care“, diagnostika v molekulární biologii
Tecan	http://www.tecan.com	Švýcarská společnost, instrumentace pro farmaceutický průmysl, biochemické, soudní a výzkumné laboratoře.
ThinXXS	http://www.thinxxs.com	Německá firma. Design a výroba mikrofluidických čipů z plastu
Translume	http://www.translume.com/	Americká společnost. Design a výroba mikrofluidických čipů ze skla
Trinean	http://www.trinean.com/	Belgická společnost. Vývoj a výroba multikanálových spektrofotometrů pro UV/VIS absorpční spektrofotometrii mikrolitrových vzorků
Tronics Microsystems	http://www.tronics-mst.com/	Francouzská společnost, která vyrábí (i mikrofluidické) čipy na zakázku
Veredus laboratories	http://www.vereduslabs.com/	Singapurská společnost. „Portable“ analyzátor. VereID Biosystem – screening DNA/RNA na čipu (např. čip VereFlu – stanovení chřipky)

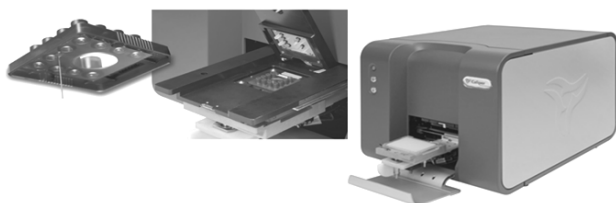
^a Tabulka aktualizována ke dni 13. leden 2011

2.2.1. Caliper Life science (<http://www.caliperls.com>)

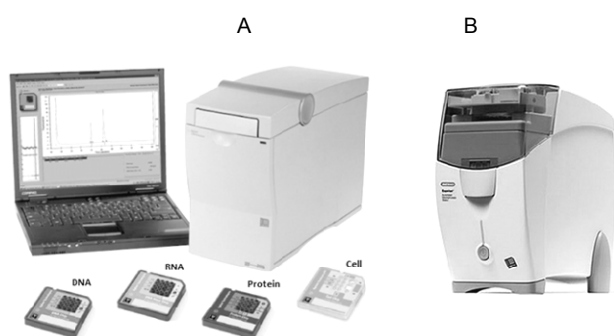
Společnost Caliper se zabývá vývojem a prodejem mikrofluidických zařízení již více než 10 let. V současnosti se tato společnost úzce specializuje na spolupráci s farmaceutickými firmami a nabízí hned několik produktů v oblasti Lab-on-a-chip. Jako příklad lze uvést systém LabChip GX/GXII (obr. 2, cit.⁶⁵). Tento přístroj pracující na principu kapilární elektroforézy je určen pro analýzu vzorků DNA, RNA a proteinů.

2.2.2. Agilent Technologies (<http://www.agilent.com>)

2100 Bioanalyzer (obr. 3A, cit.⁶⁶) byl poprvé uveden roku 1999 a stále je žádaným vybavením laboratoří díky široké variabilitě, která je zajištěna dvěma nástavci. První z nich pracuje na principu kapilární elektroforézy s LIF detekcí a je určen pro analýzu DNA, RNA a proteinů. Druhý nástavec slouží pro cytometrii. Obdobný přístroj nabízí i společnost Bio-Rad „Bio-Rad Experion Automated Electrophoresis Station“ (obr. 3B, cit.⁶⁷).



Obr. 2. **LabChip GX/GXII**, je stolním DNA, RNA a proteo-
vým analyzátozem, jeho výhodou je přímé dávkování vzorku
z mikrotitračních destiček (96 nebo 384 jamek)



Obr. 3. A) **2100 Bioanalyzer** je zařízení, které se vejde na stůl
vedle počítače a zároveň poskytuje poměrně široké uplatnění.
Agilent dodává čipy a kity pro čtyři typy analýz- DNA, RNA,
Proteiny a Cytometrie. Konkurenční přístroj B) **Bio-Rad
Experion Automated Electrophoresis Station** nabízí navíc
vylepšený design

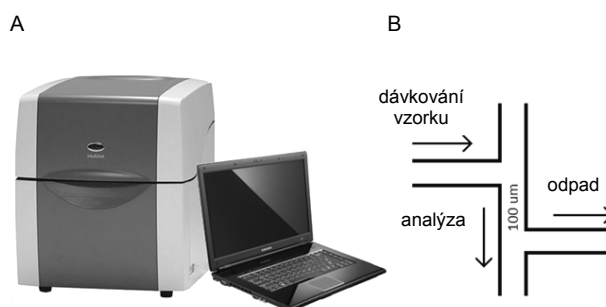
1260 Infinity HPLC-Chip/MS System (obr. 4, cit.⁶⁸)
využívá HPLC čipy vyrobené z tenkého filmu polyimidu.
V tomto materiálu jsou pomocí laserové ablace vytvářeny
povrchové struktury, z nichž některé jsou naplněny požá-
dovaným sorbentem. Po spojení několika vrstev vzniká
čip, na kterém jsou integrovány kolona pro obohacování
vzorku, kolona pro analýzu, mikroventil, veškeré spoje

a sprejovací špička. Díky tomuto uspořádání jsou na čipu
zahrnuty všechny kroky analýzy, od nadávkování vzorku
až po ESI ionizaci analytů před detekcí hmotnostním spek-
tremetrem. V současné době jsou k dispozici čipy pro pro-
teomiku, metabolomiku, analýzu malých molekul, biofar-
maceutické analýzy a pro analýzu nukleotidů. Tento výčet
se i nadále rozšiřuje díky možnosti naplnit existující čipy
sorbentem, který je požadován zákazníkem. Pokud je vyví-
nuta nová metoda, společnost Agilent nabízí spolupráci
pro přípravu nového čipu.

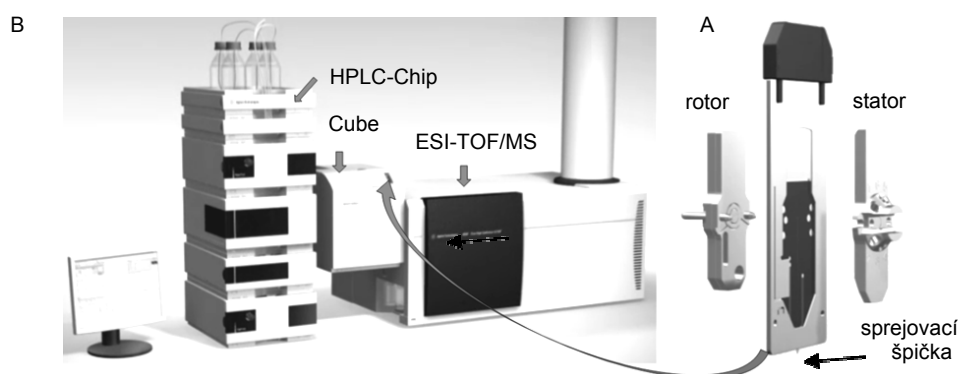
2.2.3. Shimadzu (<http://www.shimadzu.com>)

MCE-202 MultiNA (obr. 5, cit.⁶⁹) byl představen
roku 2007 a je určen pro analýzu DNA a RNA řetězců.
V principu se jedná o agarózovou gelovou elektroforézu
na čipu. V přístroji je místo pro 108 vzorků a analýza mů-
že probíhat až na čtyřech čípech současně. Další výhodou
je automatické plnění a čištění čipů. Toto řešení usnadňuje
přípravu analýzy na pouhé smíchání vzorků s reagenциemi
v kitech. Výrobce udaná životnost čipů je až 3600 ana-
lýz.

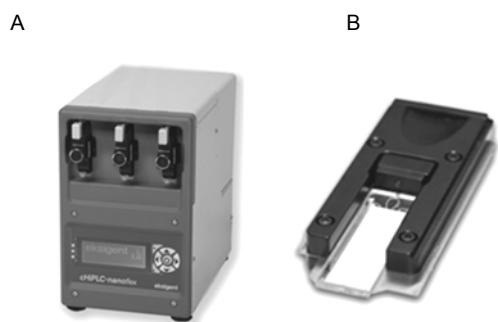
Prominence nano je nanoHPLC systém, který dosahu-
je nanolitrových průtoků mobilní fází pomocí splitování
systémem „Reflux Flow Control“⁷⁰.



Obr. 5. A) **MCE-202 MultiNA**, B) elektrokinetické dávkování
vzorku a jeho následná analýza na čipu



Obr. 4. A) **1260 Infinity HPLC-Chip/MS System**, B) čip je po vložení do HPLC-Chip Cube umístěn mezi rotor a stator, tím je
vytvořen šesticečný ventil pro dávkování a nástřik vzorku. Sprejovací špička na konci čipu je v HPLC-Chip Cube umístěna před
vstup do hmotnostního spektrometru. Přívod napětí na špičku je realizován vodivým spojením, které je vtlačeno na povrch čipu



Obr. 6. S nadstavbou cHiPLC-nanoflex lze provádět nano-HPLC separace na čipu. Je kompatibilní se všemi nanoLC systémy Eksigent. A) cHiPLC-nanoflex, B) čip

2.2.4. Eksigent (<http://www.eksigent.com>)

NanoLC a nanoLC-Ultra jsou nano HPLC systémy používající pumpy, které dosahují nanolitrových průtoků bez nutnosti splitování toku a to díky „Microfluidic Flow Control“ (MFC)⁷¹. Oba systémy mohou pracovat buď s kapilárními kolonami nebo s nadstavbou, která umožňuje separace na čipu „cHiPLC-nanoflex system“ (obr. 6, cit.⁷²).

3. Závěr

Tato práce navazuje na předchozí přehled⁷³, který se zabýval metodami výroby čipů a jejich použitím zejména pro spojení s hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou detekcí. Od vydání tohoto článku již uplynulo více než pět let a za tuto dobu mikrofluidika naznačila podstatného pokroku. Letmý pohled do historie jejího vývoje a přehled vybraných souhrnných článků, publikovaných v posledních třech letech, poskytují stručný souhrn, který může pomoci orientovat se ve stále sílícím odvětví miniaturizované instrumentální analytické chemie. Podrobnější informace lze v současnosti získat zejména v časopisech zaměřených na mikrofluidiku (např. *Lab on a Chip*⁷⁴) a v pravidelných tematických číslech časopisů zaměřených na miniaturizaci (např. *Electrophoresis*⁷⁵).

Tato práce vznikla za podpory projektů GA ČR P206/11/2377 a P301/11/2055.

LITERATURA

- Ohno K., Tachikawa K., Manz A.: *Electrophoresis* 29, 4443 (2008).
- Yager P., Edwards T., Fu E., Helton K., Nelson K., Tam M. R., Weigl B. H.: *Nature* 442, 412 (2006).
- <http://www.darpa.mil/mto/>; staženo 13. ledna 2011.
- http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/about.shtml; staženo 13. ledna 2011.
- Kopf-Sill A. R.: *Lab Chip* 2, 42N (2002).
- Lee S. J., Lee S. Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 289 (2004).
- Manz A., Graber N., Widmer H. M.: *Sens. Actuators B* 1, 244 (1990).
- Woolley A. T., Mathies R. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11348 (1994).
- Jacobson S. C., Hergenroder R., Koutny L. B., Ramsey M. J.: *Anal. Chem.* 66, 1114 (1994).
- Jacobson S. C., Ramsey M. J.: *Anal. Chem.* 68, 720 (1996).
- Woolley A. T., Hadley D., Landre P., deMello A. J., Mathies R. A., Northrup M. A.: *Anal. Chem.* 68, 4081 (1996).
- Khandurina J., McKnight T. E., Jacobson S. C., Waters L. C., Foote R. S., Ramsey M. J.: *Anal. Chem.* 72, 2995 (2000).
- Pal R., Yang M., Lin R., Johnson B. N., Razzacki S. Z., Chomistek D. C., Heldsinger D. C., Haque M., Ugaz V. M., Thwar P. K., Chen Z., Alfano K., Yim M. B., Krishnan M., Fuller A. O., Larson R. G., Burke D. T., Burns M. A.: *Lab Chip* 5, 1024 (2005).
- Zhong J. F., Chen Y., Marcus S. J., Scherer A., Quake S. R., Taylor C. R., Weiner L. P.: *Lab Chip* 8, 68 (2008).
- Lee S. J., Lee S. Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 289 (2004).
- Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel J. V.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815 (1967).
- Yao S., Anex D. S., Caldwell W. B., Arnold D. W., Smith K. B., Schultz P. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5372 (1999).
- Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., Dubrow R.: *Anal. Chem.* 73, 1207 (2001).
- Reid G. E., McLuckey S. A.: *J. Mass Spectrom.* 37, 663 (2002).
- Chen H., Fan Z. H.: *Electrophoresis* 30, 758 (2009).
- Becker H., Lowack K., Manz A.: *J. Micromech. Microeng.* 8, 24 (1998).
- Chen X. X., Wu H. K., Mao C. D., Whitesides G. M.: *Anal. Chem.* 74, 1772 (2002).
- Emrich C. A., Medintz I. L., Chu W. K., Mathies R. A.: *Anal. Chem.* 79, 7360 (2007).
- Lee J., Soper S. A., Murray K. K.: *J. Mass Spectrom.* 44, 579 (2009).
- Musyimi H. K., Guy J., Narcisse D. A., Soper S. A., Murray K. K.: *Electrophoresis* 26, 4703 (2005).
- Guttman A.: *Nature* 380, 461 (1996).
- Vanderschaeghe D., Szekrnyes A., Wenz C., Gassmann M., Naik N., Bynum M., Yin H., Delanghe J., Guttman A., Callewaert N.: *Anal. Chem.* 82, 7408 (2010).
- Fukushima K., Satoh T., Baba S., Yamashita K.: *Glycobiology* 20, 452 (2010).
- Callewaert N., Contreras R., Mitnik-Gankin L., Carey L., Matsudaira P., Ehrlich D.: *Electrophoresis* 25, 3128 (2004).
- Dang F., Kakechi K., Nakajima K., Shinohara Y., Ishikawa M., Kaji N., Tokeshi M., Baba Y.: *J. Chromatogr., A* 1109, 138 (2006).
- Zhuang Z., Starkey J. A., Mechref Y., Novotny M. V., Jacobson S. C.: *Anal. Chem.* 79, 7170 (2007).

32. Smejkal P., Szekrenyes A., Ryvolová M., Foret F., Guttman A., Bek F., Macka M., *Electrophoresis* **31**, 3783 (2010).
33. Schrum D. P., Culbertson C. T., Jacobson S. C., Ramsey J. M.: *Anal. Chem.* **71**, 4173 (1999).
34. Fiedler S., Shirley S. G., Schnelle T., Fuhr G.: *Anal. Chem.* **70**, 1909 (1998).
35. Wolff A., Perch-Nielsen I. R., Larsen U. D., Friis P., Goranovc G., Poulsen C. R., Kutter J. P., Telleman P.: *Lab Chip* **3**, 22 (2003).
36. Wlodkowic D., Cooper J. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 193 (2010).
37. Ghitun M., Bonneil E., Fortier M. H., Yin H., Killeen K., Thibault P.: *J. Sep. Sci.* **29**, 1539 (2006).
38. Cappiello A., Famigliani G., Florucci C., Mangani F., Palma P., Siviero A.: *Anal. Chem.* **75**, 1173 (2003).
39. Hernandez-Borges J., Aturki Z., Rocco A., Fanali S.: *J. Sep. Sci.* **30**, 1589 (2007).
40. Tennikova T. B., Blagodatikh I. V., Svec F., Tennikova M. B.: *J. Chromatogr.* **509**, 233 (1990).
41. Abele S., Smejkal P., Yavorska O., Foret F., Macka M.: *Analyst* **135**, 477 (2010).
42. Chervet J. P., Ursem M., Salzmann J. B.: *Anal. Chem.* **68**, 1507 (1996).
43. Ishihama Y.: *J. Chromatogr., A* **1067**, 73 (2005).
44. Becker H., Gärtner C.: *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 89 (2008).
45. Dishinger J. F., Kennedy R. T.: *Electrophoresis* **29**, 3296 (2008).
46. Tsao C. W., DeVoe D. L.: *Microfluid. Nanofluid.* **6**, 1 (2009).
47. Turgeon R. T., Bowser M. T.: *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 187 (2009).
48. Schulze P., Belder D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 515 (2009).
49. Wei D., Bailey M. J. A., Andrew P., Ryhänen T.: *Lab Chip* **9**, 2123 (2009).
50. Borecki M., Korwin-Pawłowski M. L., Beblowska M., Szmít J., Jakubowski A.: *Sensors* **10**, 3771 (2010).
51. Lim Y. C., Kouzani A. Z., Duan W.: *Microsyst. Technol.* **16**, 1995 (2010).
52. Jeong G. S., Chung S., Kim Ch., Lee S.: *Analyst* **135**, 460 (2010).
53. Zhou J. W., Ellis A. V., Voelcker N. H.: *Electrophoresis* **31**, 2 (2010).
54. Mir M., Homs A., Samitier J.: *Electrophoresis* **30**, 3386 (2009).
55. Lien K. Y., Lee G. B.: *Analyst* **135**, 1499 (2010).
56. Ali I., Aboul-Enein H. Y., Gupta V. K.: *Chromatographia* **69**, S13 (2009).
57. Peng Y., Pallandre A., Tran N. T., Taverna M.: *Electrophoresis* **29**, 157 (2008).
58. Chen H., Fan Z. H.: *Electrophoresis* **30**, 758 (2009).
59. Tran N. T., Aayed I., Pallandre A., Taverna M.: *Electrophoresis* **31**, 147 (2010).
60. Suzuki H., Takeuchi S.: *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2695 (2008).
61. Chiu D. T., Lorenz R. M.: *Acc. Chem. Res.* **42**, 649 (2009).
62. Gossett D. R., Weaver W. M., Mach A. J., Hur S. C., Tse H. T. K., Lee W., Amini H., Di Carlo D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3249 (2010).
63. Young E. W. K., Beebe D. J.: *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1036 (2010).
64. Gupta K., Kim D., Ellison D., Smith C., Kundu A., Tuan J., Suh K., Levchenko A.: *Lab Chip* **10**, 2019 (2010).
65. <http://www.caliperls.com/products/labchip-systems/labchip-gx.htm>; staženo 6. leden 2011
66. <https://www.genomics.agilent.com/CollectionOverview.aspx?PageType=ApplicationSubPageType=ApplicationOverview&PageID=275>; staženo 6. ledna 2011.
67. <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/adirect/biorad?catID=e88b061b-37dc-4610-b4b7-0ef925f622f9&cmd=BRCatgProductDetail&country=US&javascriptDisabled=true&lang=en&ts=1&vertical=LSR#>; staženo 13. ledna 2011.
68. <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/Instruments/lc/analytical/systems/1200serieshplc-chipms/pages/gp15389.aspx>; staženo 13. ledna 2011.
69. <http://www.shimadzu-biotech.net/pages/products/2/multina.php>; staženo 13. ledna 2011.
70. <http://www.shimadzu.com/products/lab/ls/oh80jt000000ajnk.html>; staženo 13. ledna 2011.
71. <http://www.eksigent.com/hplc/tech/mfc.php>; staženo 13. ledna 2011.
72. <http://www.eksigent.com/hplc/products/nanoLC/nanoflex.php>; staženo 13. ledna 2011.
73. Grym J., Foret F.: *Chem. Listy* **99**, 915 (2005).
74. Lab on a Chip – <http://pubs.rsc.org/en/Journals/JournalIssues/LC>; staženo 13. ledna 2011.
75. Electrophoresis – [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1522-2683/issues](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1522-2683/issues); staženo 13. ledna 2011.

P. Smejkal^{a,b} and F. Foret^a (^a *Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*; ^b *University of Pardubice, Pardubice*): **Microfluidics in Bioanalytical Instrumentation**

Recent advances in microfluidics and microfabrication technology resulted in a new product line of analytical instruments marketed as microfluidic analyzers. Indeed, miniaturization of analytical instruments and the use of microfabricated “chips” is regarded as an obvious step in achieving fast analyses, reduction of reagent and sample consumption as well as decreasing the cost per analysis. This review covers recent progress in the development and applications of electrophoretic and chromatographic systems based on microfluidic techniques.